革新的医薬品・医療機器・再生医療製品等実用化促進事業

「医療機器レギュラトリーサイエンス機構の創設による

Engineering Based Medicine に基づく非臨床評価法の確立」

ガイドライン案

左心補助人工心臓用脱血管の In Vitro 血栓性試験法

平成 27 年 5 月

早稲田大学 先端生命医科学センター（TWIns）

目 次

規格（案）

左心補助人工心臓用脱血管の In vitro 血栓性試験方法

Method for in vitro thrombogenicity testing for inflow cannula of left ventricular assist system

1.　適用範囲

この規格は，左心補助人工心臓用脱血管の血栓形成性を，In vitro で評価する方法について規定する。特に，この規格においては，使用環境を模擬した血液循環回路を用いて，血液との接触初期の左心補助人工心臓用脱血管への血栓の付着と剥離を評価するための試験方法に関して規定する。

2.　定義

この規格で用いる主な用語及び定義は，次による。

a)　**左心補助人工心臓**　心臓を体内に温存したまま，血液ポンプ機能を補助又は代行する装置。血液ポンプと駆動装置からなる。血液ポンプによって左心室または左心房から血液を受け取り，大動脈へ送り出す。

b)　**左心補助人工心臓用脱血管**　左心補助人工心臓に送血するためのチューブで，使用時に片端は左心室に挿入され，他端は左心補助人工心臓に接続される。

c)　**付着血栓**　血液及び生理食塩液又はリン酸緩衝液循環後，試験試料壁に付着した血栓を指す。

d)　**剥離血栓**　血液循環後，試験試料壁に付着した血栓のうち，生理食塩液又はリン酸緩衝液の循環により剥がれた血栓を指す。

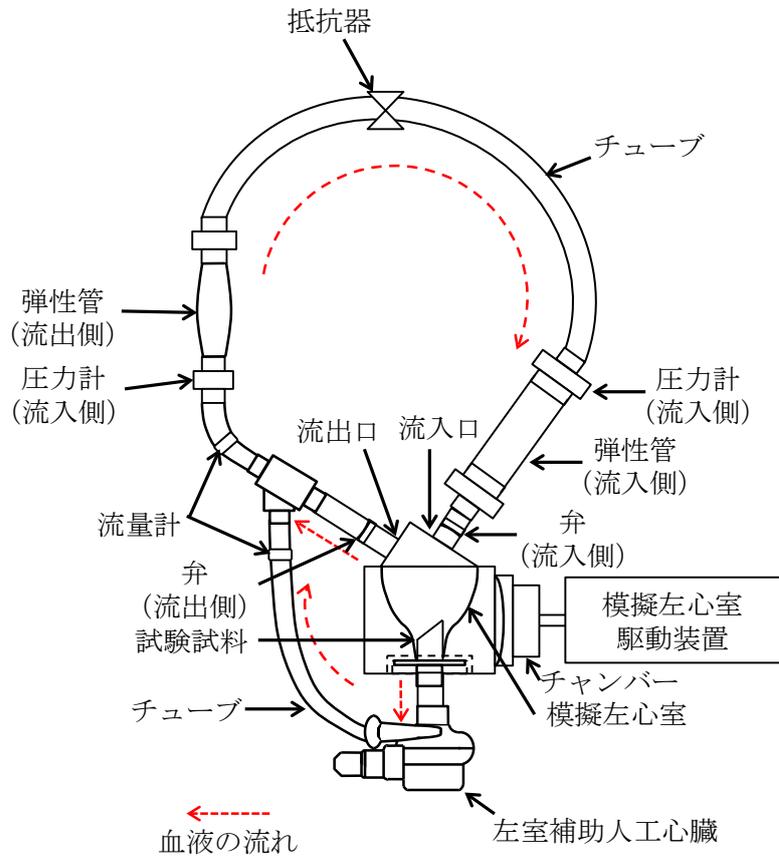
e)　**最終製品**　左心補助人工心臓用脱血管として，出荷可能な製品を指す。滅菌品については，滅菌後の製品を指す。ただし，出荷後，用時加工・調製して使用するものについては，実際に使用する状態の製品を指す。

3.　試験回路

3.1 試験回路の構成

左心補助人工心臓用脱血管（試験試料）及び左心補助人工心臓，弾性管，流入口と流出口近位に弁を設置した模擬左心室をチューブで接続した試験回路に，模擬左心室駆動装置，流量計，圧力計，抵抗器を設置する。図 1 に試験回路と試験回路に設置する装置の一例を示す。試験実施時に，恒温槽内に試験回路を設置し，37±2℃で試験を行う。

図 1　試験回路及び試験回路に設置する装置の一例

抵抗器
チューブ
弾性管（流出側）
圧力計（流入側）
圧力計（流入側）
流出口　流入口
弾性管（流入側）
流量計
弁（流入側）
弁（流出側）
模擬左心室駆動装置
試験試料
チャンバー
チューブ
模擬左心室
血液の流れ
左室補助人工心臓

3.2.試験回路に用いる器材

試験回路に用いる器材を次に示す。試験試料を除く試験回路に血栓が生じないように，必要に応じて以下の器材の血液接触面を抗凝固処理する。

a)　**左心補助人工心臓**　市販又は試験試料の取扱説明書等で規定される左心補助人工心臓を用いる。

b)　**チューブ**　目視で内腔を確認できる透明なチューブを使用する。

c)　**弾性管**　試験回路の圧力を調整するために伸縮可能なチューブを設置する。大動脈の脈圧を模擬するための弾性管（流出側）と静脈脈圧を模擬するための弾性管（流入側）を設ける。

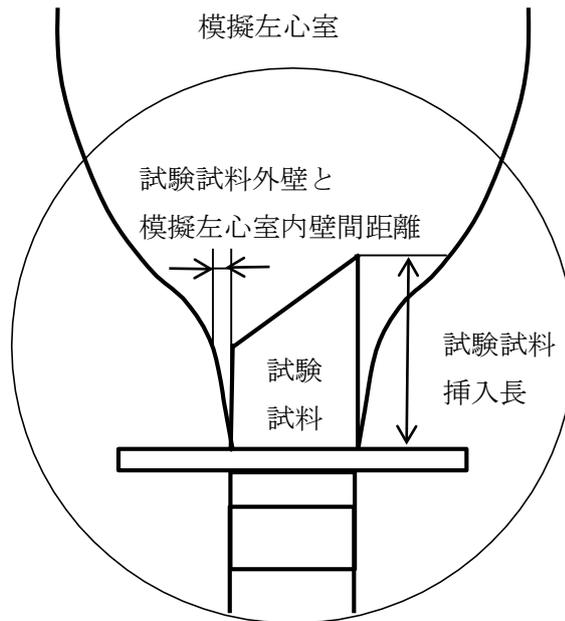
　注記　弾性シリコーンやセグメント化ポリウレタンチューブを使用することができる。

d)　**模擬左心室**　試験試料使用時の状態を想定して，模擬左心室の形状や機能を設定する。

形状　試験試料の挿入部先端の外壁と模擬左心室内壁間の距離を 2±1mm になるよう設計する（図 2）。試験試料の挿入長は，試験試料の全長から 7±1mm を差し引い

た長さとする。

機能　シリコーン等の弾性材料で作製し，駆動装置から発生される圧力に対応して，拍動するよう設計する。

図 2　模擬左心室の試験試料挿入部の模式図

注記 1　試験試料外壁と心室又は心房内壁間の距離が短いほど，試験試料周囲の血液が滞留し易い。使用時に想定される最も短い距離として，2mm（左心室心尖部に挿入された場合）を設定している。これ以外の試験試料外壁と模擬左心室内壁間の距離を設定する場合，設定した根拠を説明しなければならない。

注記 2　拡張型心筋症患者の左心室尖部の厚さが 6〜8mm であることから，この厚みを差し引いた長さを模擬左心室への挿入長としている。

注記 3　模擬左心室の拍動は、使用状況を参考に設定する。例えば 70 回/分で拍動させる。

e) **弁**　模擬左心室内への血液の逆流を防止するため，流出口と流入口に弁を設ける。

3.3　試験回路に設置する装置

a) **模擬左心室拍動装置**　模擬左心室に拍動を与える。

例　水で満たしたチャンバーに模擬左心室を入れ，チャンバーに設けたダイアフラムを空気圧（陽圧・陰圧）で変化させることにより、拍動を与えることができる。

b）**流量計**　超音波血流計，電磁流量計などを試験回路に設置する。

c）**圧力計**

d）**抵抗器**　血液循環時に試験回路全体の圧力を上昇させるため，チューブを変形させ，この状態を維持できるものを用いる。

3.4 その他の装置及び器具

a）　**恒温槽**　37±2℃の精度を有すること。

b）　**フィルター**　ポアサイズ 100 μ m を用いる。

3.5 試験回路の確認

試験実施前に試験に用いる回路について，生理食塩液又はリン酸緩衝液を用いて次のことを確認する。

a）　試験回路の各接合部から漏れが生じないこと。

b）　試験回路の容量。

c）　模擬左心室を拍動させた時、左心補助人工心臓のポンプ回転数，抵抗器を操作して，計画した平均総血流量，最高内圧，最低内圧の条件を設定できること。

4.　血液調製

a）　ヘパリンを添加した血液を使用し，Activated clotting time（ACT）を 250～270 秒に調整すること。

b）　3.5 項の試験回路内容量以上の血液を採血すること。

注記　試験に必要な血液量を得るために，ウシやブタなど大型動物の血液を使用することが望ましい。試験試料と対照試料の試験回路に必要な血液量を同一個体から採取すること。

c）　採血開始から試験に使用するまで空気接触を避け，採血開始から 4 時間以内に試験に使用すること。

5.　試料

5.1　試験試料

最終製品（左心補助人工心臓用脱血管）を試験試料に用いる。最終製品を模擬した試料を試験試料として用いる場合は，その同等性または妥当性を説明すること。

5.2　対照試料

対照試料を設定する。同一個体から採取した血液を用いて，試験試料と同時に試験を行わ

なければならない。

注記 1　一般的には，血栓形成リスクが低い既知の対照試料を設定し，この結果と比較することで，試験試料使用時の血栓症のリスクを評価する。

注記 2　対照試料を用いた回路についても，3.5 項を確認すること。試験回路は試験試料（対照試料）を除き同じ構成にするのが望ましい。

6.　試験方法

a)　3.1 項記載の試験試料を含む試験回路を恒温槽（37±2℃）に設置する。

b)　4 項記載の血液で試験回路内を充填する。

注記　試験回路内に空気（気泡）が残らないよう注意する。

c)　模擬左心室及び左心補助人工心臓を稼働させて計画した平均総血流量，最高内圧，最低内圧にし，血液循環を開始する。

注記　試験に用いる一般的な平均総血流量，最高内圧，最低内圧を以下に示す。

平均総血流量	最高内圧	最低内圧
4Ｌ/min	80～90mmHg	60～70mmHg

d)　4 時間の血液循環を行い，左心補助人工心臓のポンプを停止する。

e)　試験回路内の血液を取り除き，付着物を剥がさないように注意しながら，試験試料（対照試料）を新しい回路に取り付ける。

f)　試験回路内を生理食塩液又はリン酸緩衝生理食塩液で 3 時間循環させた後，フィルターを用いて回収する。フィルターに残った血栓（剥離血栓）の有無を確認する。血栓が認められた場合には，血栓の性状を調べて記録する。観察後，写真を撮影する。

g)　付着物を剥がさないように注意しながら，試験試料を取り出し，目視により，血栓の付着状態を観察する。観察後，写真を撮影する。

h)　必要に応じて，試験試料に付着した血栓（付着血栓）とフィルターに残った血栓（剥離血栓）を回収して，それぞれの量を測定する。

i)　試験前後の血液の血小板数を記録する

注記 1　目視により血栓の付着状態や剥離した血栓を評価することは, 使用時の血栓形成リスクや人体に与える影響など評価する上で重要な情報となる。付着血栓量および剥離血栓量を定量的に評価することで、目視による定性的結果を補足し、対照材料の血栓形成程度の違いを明確にすることができる。目視による観察で，付着及び剥離血栓が認められない場合や試験材料と対照材料で付着血栓量または剥離血栓量の違いが明らかな場合は，血栓量を定量しなくても良い。

注記 2　付着又は剥離血栓をドデシル硫酸ナトリウム水溶液で溶解してタンパク質総量として BCA 法や Micro BCA 法で定量することができる。

7.　結果の表示

7.1　試験結果の表示は，次による。

a)　剥離血栓の写真

b)　剥離血栓の観察結果（状態など）

例

状態	線状、凝集塊等、見た目の様子

c)　剥離血栓の定量結果

剥離した血栓をドデシル硫酸ナトリウム水溶液で溶解し，タンパク質総量として BCA 法や Micro BCA 法で測定した結果を示す。または，定量計測可能であれば，秤で計量してもよい。

d)　付着血栓の写真

e)　付着血栓の観察結果（付着・浮遊，付着部位など）

例

付着・浮遊	脱血管への血栓の付着の有無，付着部位から一部浮遊している血栓の有無
付着部位	脱血管壁上での付着部位，脱血管と左心室モデルの境界での付着部位

f)　付着血栓の定量結果

付着血栓量を測定した場合，それぞれの結果を示す。付着した血栓をドデシル硫酸ナトリウム水溶液で溶解し，タンパク質総量として BCA 法や Micro BCA 法で測定した結果を示す。または，定量計測可能であれば，秤で計量してもよい。

注記　試験試料と対照試料の測定値の平均値を統計解析に基づき比較することによって，血栓の飛散リスクの程度を評価しても良い。この場合は試験回数を記録する。

7.2　次の試験条件については，試験結果に付記する。

a)　試験を実施した機関の名称，住所，試験責任者の氏名，試験開始日及び試験終了日

b)　試験試料及び対照試料を特定する要素（名称，製造業者名，製造番号，原材料名など）

c)　試験回路の構成（回路図，各装置を特定する要素），試験回路の容量

d)　模擬左心室内の試験試料の位置（試験試料外壁と模擬左心室内壁間の距離）及び試験試料挿入長

e)　使用した血液（動物種，採血量，ACT，採血してから血液循環開始までの時間，試験前後の血小板数など）

f)　血液循環条件（平均総血流量，最大内圧，最小内圧，補助人工心臓の回転数）

g)　模擬左心室拍動条件（1 分間あたりの拍動回数など）

h)　血栓量の測定方法

参考規格

［1］ISO 10993-4:2002/Amd.1:2006, Biological evaluation of medical devices Part 4: Selection of tests for interactions with blood

留意事項

現時点では本試験法により動物試験が不要となるわけではなく、動物試験やヒトでの臨床試験においても明確に判定できない急性期の血栓形成とその脱落量を定量化し、その他の試験法により得られる成績を補完することが本試験法の意義である。

附属書Ａ　試験回路の情報

この附属書は，試験回路を作製するための参考情報を提供するもので，規定の一部ではない。実施例の模擬左心室および弾性管の形状，容量及び材質を次に示す。

A.1　模擬左心室

ａ）模擬左心室内腔の材質及び形状

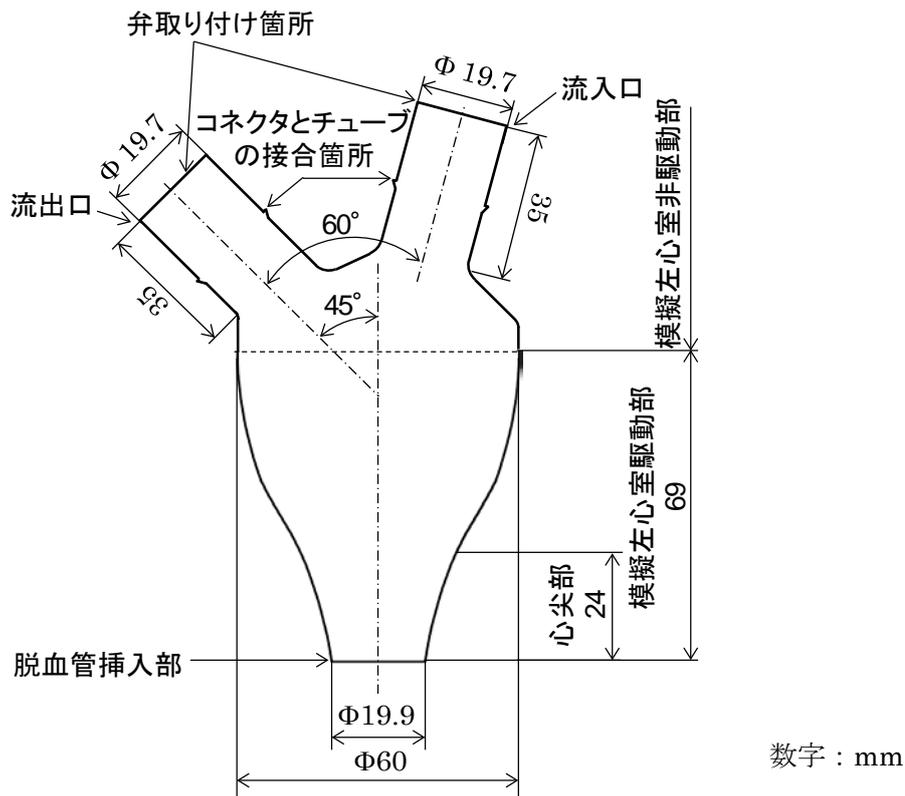
模擬左心室駆動部の材質：シリコーン

模擬左心室非駆動部の材質：ポリウレタン

模擬左心室内腔の形状：図Ａ.1 に示す。

模擬左心室内部容量：157mL

図 A.1　模擬左心室内腔の形状図

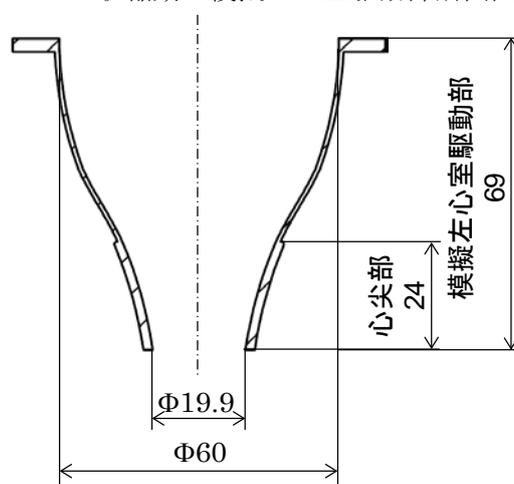
数字：mm

ｂ）模擬左心室の駆動部及び心尖部

重症心不全患者では、心尖部は心拍動時にほとんど動かないことを考慮し，実施例では心尖部が動きにくいモデルが作製された。心尖部以外の部位はシリコーン 1 層，心尖部は異なる弾性率のシリコーンの 2 層で作製されている。模擬左心室駆動部の心尖

部以外の部位と心尖部におけるヤング率と厚さを表Ａ.1 に示す。また、心臓収縮期の模擬左心室駆動部断面図を図Ａ.2 に示す。

表Ａ.1 模擬左心室駆動部の心尖部以外の部位と模擬心尖部におけるヤング率と厚さ

	心尖部以外の部位	心尖部	
		内腔側	外腔側
ヤング率	5.7×10^{-2} MPa	5.7×10^{-2} MPa	8.3×10^{-1} MPa
厚さ	0.3 mm	0.3 mm	1.2 mm

図Ａ．２~~１~~　収縮期の模擬左心室駆動部断面図

Ａ.2　弾性管（流入側及び流出側）

実施例で用いられた流入側・流出側の弾性管の材質，内径，厚さ，長さ，ヤング率を表Ａ.2 に示す.

表Ａ.2 本試験で用いた流入側・流出側の弾性管の材質，内径，厚さ，長さ，ヤング率

	流入側弾性管	流出側弾性管
材質	シリコーン	セグメント化ポリウレタン
内径	30 mm	25 mm
厚さ	2±0.2 mm	150±10 μm
長さ	200 mm	200 mm
ヤング率	5.7×10^{-2} MPa	1.2×10 MPa

A.3　試験回路長の参考値（mm）L: 1400